

L'accreditamento Uni Cei En Iso/Iec 17025 nel laboratorio di genetica forense

Le tecnologie di sequenziamento ad alte prestazioni (Next Generation Sequencing, NGS) sono ormai diventate di uso comune nella ricerca biomedica, ma trovano sempre più spazio nella diagnostica, contribuendo fortemente alla realizzazione della medicina traslazionale e gettando le basi per la futura medicina "personalizzata".

L'impiego della genetica forense come strumento investigativo

L'analisi del Dna è oggi il sistema di identificazione personale più accurato utilizzato in ambito giudiziario, sia penale che civile. La genetica forense è una branca delle scienze forensi che si basa sull'applicazione di tecniche di genetica molecolare attraverso le quali è possibile caratterizzare, a partire da una traccia biologica, particolari marcatori genetici costituiti da polimorfismi di lunghezza del Dna (Dna microsatellite nucleare o Short Tandem Repeat) che possono assumere pesi molecolari diversi da individuo a individuo. L'insieme di un certo numero di questi marcatori ad alta variabilità inter-individuale viene detto profilo genetico. Si tratta quindi di un'"impronta genetica" che consente di identificare in maniera sostanzialmente univoca una persona. Con i sistemi attuali, che utilizzano set di circa 20 marcatori, la probabilità che una persona presa a caso in una certa popolazione possieda un determinato profilo prefissato è nell'ordine di circa 10^{-28} (Random Match Probability). La sensibilità delle tecniche oggi disponibili è elevatissima, è possibile ottenere un profilo genetico completo a partire da 20-30 picogrammi di Dna genomico umano (equivalente al contenuto di Dna di quattro-cinque cellule diploidi). Le stesse tecniche utilizzate in ambito investigativo penale vengono inoltre impiegate anche nei casi di paternità controverse per stabilire con estrema affidabilità i legami di consanguineità. I sistemi per il sequenziamento massivo di nuova generazione, inoltre, stanno aprendo nuove possibilità, come la messa a punto di pannelli ibridi di analisi in grado di individuare, a partire da poche cellule nucleate, non solo il profilo genetico ma anche caratteristiche individuali com-

plesse come il colore degli occhi, il colore dei capelli e l'origine ancestrale del donatore.

L'adesione dell'Italia al Trattato di Prüm

Con l'adesione al Trattato di Prüm, nato per rafforzare la collaborazione transfrontaliera tra gli Stati membri dell'Unione Europea per il contrasto a terrorismo e criminalità, è iniziato, per l'Italia, il percorso parlamentare per l'istituzione di una banca dati nazionale del Dna (Bdn-Dna) conclusosi con il DPR nr 87 del 7 aprile 2016. La Bdn-Dna gestirà i flussi dei profili genetici ottenuti da soggetti sottoposti a provvedimenti giudiziari per reati non colposi, da tracce biologiche rinvenute sulle scene del crimine, da cadaveri a identità sconosciuta e da effetti personali (o da consanguinei) di persone scomparse. La Bdn-Dna diventerà quindi nei prossimi anni un potente strumento a disposizione degli organi di polizia nazionali e internazionali in grado, attraverso il confronto dei profili genetici, di identificare soggetti responsabili di atti criminali e di facilitare il riconoscimento di cadaveri non identificati.

Lo standard di qualità richiesto per le attività di scienze forensi: Uni Cei En Iso/Iec 17025

Gli Stati aderenti al Trattato hanno condiviso la necessità di definire uno standard di qualità di riferimento per tutti i laboratori che si occupano di scienze forensi e, in particolare, di analisi del DNA a scopo identificativo. Il Consiglio dell'Unione Europea, con la decisione quadro del 30 novembre 2009, n. 2009/905/GAI, ha stabilito che le strutture cooperanti (in Italia il Laboratorio Centrale del Ministero della Giustizia, i laboratori scientifici delle Forze dell'Ordine e gli Istituti di elevata specializzazione pubblici o privati operanti nel settore della genetica forense che intendano mettere a disposizione della magistratura i propri servizi) devono essere accreditate secondo lo standard tecnico internazionale Uni Cei En Iso/Iec 17025.

Significato dell'accreditamento

L'accreditamento è un processo attraverso il quale un ente terzo stabilisce l'imparzialità e la competenza di un laboratorio di prova. Dal 2009, l'Ente unico di accreditamento designato dal Governo italiano è Accredia, organizzazione che fa parte delle reti European co-operation for Accreditation (Ea), International Accreditation Forum (Iaf) e International Laboratory Accreditation Cooperation (Ilac). Lo standard 17025,

a differenza di altri livelli di norme ISO, contempla requisiti cogenti che riguardano tutti i fattori che possano influenzare l'affidabilità e l'accuratezza dei risultati. L'accreditamento a questa norma è quindi una garanzia di qualità del servizio offerto all'utente finale. Gli elementi principali tenuti in considerazione dalla norma 17025 riguardano la competenza tecnico scientifica degli operatori, la validazione e l'idoneità dei metodi di prova utilizzati, le procedure per la stima dell'incertezza di misura, la taratura periodica e certificata delle strumentazioni e le garanzie di qualità dei risultati delle prove. La Iso/Iec 17025 prevede inoltre che il sistema qualità sia gestito in conformità alla norma Iso 9001.

I requisiti strutturali

Il laboratorio che intende accreditarsi deve disporre di locali sufficientemente ampi con condizioni ambientali idonee allo svolgimento della prova. Allo scopo di limitare quanto più possibile contaminazioni da DNA esogeno il laboratorio deve separare fisicamente gli ambienti in cui vengono eseguite operazioni tra loro incompatibili, come ad esempio le fasi analitiche pre-amplificazione e post-amplificazione. Al fine di mantenere il massimo livello di performance delle strumentazioni soggette a taratura, quest'ultima deve essere effettuata da centri a loro volta accreditati.

Il personale

Il personale che opera all'interno del laboratorio possiede una formazione universitaria di base. Deve raggiungere una specifica competenza mediante affiancamento prima di poter essere abilitato all'esecuzione autonoma della prova. La competenza acquisita sul campo viene inoltre rafforzata da un programma di aggiornamenti periodici che ne consenta il mantenimento nel tempo.

Documentazione e tracciabilità

La Norma prevede la preparazione della documentazione relativa a istruzioni operative e protocolli per tutte le attività associate alla prova. Al laboratorio che richiede l'accreditamento viene richiesto, attraverso registrazioni dettagliate, di dare evidenza di tutto il processo operativo: dall'eventuale campionamento alla stesura del rapporto di prova finale passando per le varie fasi analitiche (estrazione del DNA, quantificazione, amplificazione in vitro ed elettroforesi capillare). Le registrazioni comprendono anche tutti i processi collegati alla prova come la documentazione fotografica dei reperti acquisiti e la loro



FRANCESCO BINNI

Sezione di Genetica Forense
Uoc Laboratorio di Genetica Medica,
Università
La Sapienza
Ao San Camillo-Forlanini, Roma



PAOLA GRAMMATICO
Direttore Uoc
Laboratorio di Genetica Medica,
Università
La Sapienza
Ao San Camillo-Forlanini, Roma

catena di custodia, i riferimenti ai lotti degli strumenti e dei reagenti utilizzati, i nominativi degli operatori che hanno eseguito la prova, le verifiche periodiche di performance del metodo mediante utilizzo di materiali di riferimento, i test per il monitoraggio delle contaminazioni ambientali e così via.

La validazione del metodo di prova

I metodi utilizzati dal laboratorio devono essere riconosciuti a livello internazionale, vengono sottoposti a validazione interna mediante materiali di riferimento certificati e la stima dell'incertezza di misura avviene attraverso prove effettuate dal laboratorio stesso su matrici biologiche diversificate. Non sono ritenuti sufficienti dalla Norma, infatti, i riferimenti sulla stima dell'incertezza di misura indicati nei manuali d'uso delle case produttrici dei sistemi utilizzati in quanto vi possono essere scostamenti causati da vari fattori come, ad esempio, la variabilità derivante dall'utilizzo di strumentazioni diverse. Conoscere l'incertezza di misura del metodo che si sta utilizzando è cruciale per identificare le fonti che la causano e minimizzare gli errori. È necessario che il laboratorio stabilisca sperimentalmente le soglie analitiche. È previsto l'utilizzo di controlli per il monitoraggio di ogni fase, come ad esempio l'inserimento di controlli negativi di estrazione del Dna, controlli negativi di amplificazione e Dna a profilo noto. È inoltre indicato definire dei piani di monitoraggio delle contaminazioni attraverso la creazione di *database di esclusione* contenenti i profili genetici dei soggetti che operano all'interno del laboratorio e dei visitatori che, opportunamente autorizzati e sotto supervisione, accedano a vario titolo all'interno delle aree tecniche (consulenti tecnici, periti e personale addetto alle manutenzioni). La Norma prevede la partecipazione ad almeno un *proficiency test* ogni anno con rilascio di certificato di superamento.

Il certificato di accreditamento

Il rilascio dell'accREDITamento da parte di Accredia avviene attraverso due fasi: un esame documentale propedeutico ed una visita ispettiva in sede. Una volta conseguito, il certificato di accREDITamento ha una durata di quattro anni durante i quali il laboratorio viene sottoposto a visite di sorveglianza con frequenza annuale. Prima della scadenza dei quattro anni il laboratorio può richiedere il rinnovo seguendo le stesse modalità previste per il primo accREDITamento.